

بررسی کارآیی روش Zeta در جداسازی اسپرم های با مورفولوژی و ساختار کروماتین طبیعی

مهناز شایسته مقدم*، دکتر محمد حسین نصر اصفهانی**، دکتر شهناز رضوی***، دکتر حبیب اله

ناظم†، محمدرضا دیمه*، مرضیه تولایی††

*دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی - دانشگاه پیام نور، تهران، **دانشیار گروه آندروولوژی - جنین شناسی - پژوهشگاه رویان تهران و مرکز باروری و ناباروری اصفهان، ***دانشیار گروه آناتومی - دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، †استادیار گروه بیوشیمی - دانشگاه پیام نور تهران، †† مربی گروه آندروولوژی - جنین شناسی - پژوهشگاه رویان اصفهان.

تاریخ دریافت: ۱۳/۸/۸۶ تاریخ تایید: ۱۸/۱۲/۸۶

چکیده:

زمینه و هدف: جداسازی اسپرم های بالغ با مورفولوژی و ساختار کروماتین طبیعی برای انجام تکنیک های کمک باروری لازم می باشد. در حال حاضر، متدهای مختلفی برای جداسازی اسپرم بالغ وجود دارد. یکی از این متدها، انتخاب اسپرم های بالغ بر اساس شارژ الکتریکی غشاء است. هدف از این مطالعه ارزیابی تاثیر پتانسیل Zeta در جداسازی اسپرم های بالغ با مورفولوژی و ساختار کروماتین طبیعی می باشد. **روش بررسی:** در این مطالعه توصیفی - تحلیلی مایع منی از ۷۰ زوج نابارور مراجعه کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان جمع آوری شد. آنالیز مایع منی بر اساس معیار سازمان جهانی بهداشت (WHO) صورت گرفت. از باقیمانده نمونه برای انجام روش Zeta استفاده شد. سپس مورفولوژی، کمبود پروتئین و فراگمتاسیون DNA به ترتیب با استفاده از رنگ آمیزی پاپانیکولاو، رنگ آمیزی CMA3 (Chromomycin A3) و تست SCD (Sperm chromatin dispersion) انجام گرفت. نتایج گروه Zeta با کنترل مقایسه و با استفاده از آزمون های آماری ضریب همبستگی و t زوجی تجزیه و تحلیل شد. **یافته ها:** نتایج این مطالعه نشان داد که میانگین مورفولوژی غیرطبیعی، درصد کمبود پروتئین و نیز درصد فراگمتاسیون DNA به ترتیب در گروه کنترل $88/19 \pm 7/37$ ، $67/17 \pm 17/34$ ، $32/87 \pm 8/65$ و در گروه Zeta $80/17 \pm 10/26$ ، $58/40 \pm 18/20$ ، $18/19 \pm 8/64$ می باشد. گروه Zeta بطور معنی داری باعث جداسازی اسپرم ها از نظر مورفولوژی، سلامت DNA و محتویات پروتئین طبیعی نسبت به گروه کنترل می شود ($P < 0/05$). **نتیجه گیری:** با استفاده از روش Zeta می توان اسپرم های بالغ با مورفولوژی، محتوی پروتئین طبیعی و DNA سالم را جدا کرد.

واژه های کلیدی: اسپرم، تست Zeta، پروتئین، فراگمتاسیون DNA، مورفولوژی.

مقدمه:

امبریولوژیست جایگزین می شود، که اساس این انتخاب بر پایه مورفولوژی و تحرک اسپرم می باشد. این انتخاب وابسته به بزرگ نمای میکروسکوپ و وجود اسپرم متحرک در نمونه می باشد (۱). مطالعه Bartoov و همکاران نشان داده که اسپرم های دارای مورفولوژی و هسته طبیعی انتخاب شده بوسیله میکروسکوپ های

در جریان باروری طبیعی اسپرم های سالم که دوره بلوغ را به طور کامل طی کرده اند به وسیله مکانیسم انتخاب طبیعی جدا می شوند تا در فرایند لقاح شرکت کنند در حالی که در عمل ICSI (Intracytoplasmic sperm injection) مرحله انتخاب طبیعی اسپرم با انتخاب اسپرم توسط یک

ویژه منجر به ایجاد درصد بالاتری از لقاح، لانه گزینی و باروری می شود (۲). علی رغم این پیشرفت ها، نگرانی هایی برای تزریق اسپرم های آنوپلوئیدی و دارای فراگمتاسیون DNA به داخل اووسیت در روش ICSI باقی می ماند. همچنین تحقیقات نشان داده که شکل ظاهری اسپرم بیانگر وجود یا فقدان آنوپلوئیدیهای کروموزومی نیست. بنابراین به نظر می رسد شکل ظاهری اسپرم به تنهایی یک پارامتر مناسب برای انتخاب اسپرم نیست و روش های دیگر برای انتخاب یک اسپرم نرمال باید بکار گرفته شود (۳). اخیراً روشهای جدیدی برای انتخاب اسپرم جهت انجام عمل ICSI معرفی شده اند که می توان به روشهای الکتروفورز و Zeta بر پایه بار الکتریکی سطح اسپرم (۵،۴) روش اتصال به اسید هیالورونیک (HA) بر پایه رسپتورهای HA (۳) Sperm magnetic cell sorter بر اساس مارکرهای آپوپتوتیک مثل AnnexinV و FAS (۶) اشاره نمود. روش Zeta در سال ۲۰۰۶ توسط Chan و همکارانش به عنوان یک روش جداسازی اسپرم معرفی شد (۵). محققین در تحقیقاتشان نشان دادند، اسپرم بالغ دارای بار الکتریکی در حدود ۱۶- تا ۲۰- میلی ولت می باشد (۷،۵) که در اثر ظرفیت یابی (۹،۸) و یا مواجه شدن با نور آمینداز رحمی یا مایع فولیکولی این بار الکتریکی که تحت عنوان پتانسیل Zeta است، کاهش می یابد (۱۰). با تشکیل سیالوگلیکوپروتئینهای باردار در سطح غشای اسپرم در طی عبور اسپرم از اپیدیدیم سه شکل مختلف گلیکوپروتئین Gp20-CD52 به غشای پلاسمایی اسپرم توسط پیوندهای گلیکوزیل فسفاتیدیل اینوزیتول متصل می شود (۹،۱۳-۱۱).

اسپرم در طی روند بلوغ دچار یک سری تغییرات مورفولوژیک و بیوشیمیایی می شود که می توان به جابجایی هیستونهای هسته ای با پروتئین در طی مرحله اسپرمیوژن اشاره کرد (۱۴). بیماران نابارور به طور معنی داری دارای اسپرماتوزوا با کمبود پروتئین می باشند که در نهایت منجر به کاهش تراکم DNA می گردد. رنگ آمیزی کرومومایسین A3 (CMA3)

برای بررسی تراکم DNA و بررسی کمبود پروتئین هسته اسپرم بکار می رود (۱۵). مطالعات قبلی بیانگر این است که در افراد نابارور درصد اسپرم های CMA_3^+ همچنین افزایش قابل توجهی داشته است (۱۶،۱۷). همچنین تحقیقات نشان می دهد که بین نتایج حاصل از رنگ آمیزی با کرومومایسین A3 و نتایج حاصل از تکنیک های کمک باروری رابطه معنی داری وجود دارد (۲۰-۱۸). برای مثال عدم موفقیت در انجام تکنیک ICSI می تواند مربوط به کمبود پروتئین در طی اسپرمیوژن باشد (۲۰). علاوه تحقیقات نشان داده است که فراگمتاسیون DNA اسپرم انسان نیز ممکن است بر روی نتایج تولید مثل تاثیر منفی گذارد. به طور تقریبی ۱۰ درصد از اسپرماتوزوای مردان بارور و ۲۵-۲۰ درصد از اسپرماتوزوای مردان نابارور دارای سطوحی از فراگمتاسیون DNA هستند (۲۱،۲۰). Sakkas و Shen و همکاران عوامل متعددی از جمله: کمبود پروتئین، تغییر در میزان بیان آنزیم توپوایزومراز II، آپوپتوز، رادیکالهای آزاد اکسیژن (Reactive oxygen species=ROS)، داروها، شیمی درمانی، پرتو درمانی، استعمال دخانیات و واریکوسلی را به عنوان علل فراگمتاسیون DNA اسپرم گزارش نموده اند (۲۲،۲۳). از آن جایی که میزان کمبود پروتئین و فراگمتاسیون DNA اسپرم نقش بسیار مهمی در باروری و تکوین جنین دارند، لذا این تحقیق با هدف ارزیابی کارآیی پتانسیل Zeta برای انتخاب اسپرم های نرمال از نظر مورفولوژی، سلامت DNA و محتویات پروتئین نسبت به گروه کنترل انجام شده است.

روش بررسی:

این تحقیق یک مطالعه توصیفی و تحلیلی است. در این مطالعه از مایع منی ۷۰ زوج نابارور مراجعه کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان از مهرماه ۱۳۸۵ تا خرداد ۱۳۸۶ استفاده شد. آنالیز معمول مایع منی که شامل غلظت تحرک و مورفولوژی است، طبق معیار

WHO انجام گرفت (۲۴). لازم بذکر است تمامی مواد مصرفی در این مطالعه بجز موارد اشاره شده در متن از شرکت سیگما (U.S.A) تهیه گردید.

آماده سازی اسپرم:

مایع منی را درون لوله سانتریفوژ ریخته و به مدت ده دقیقه در دور ۲۰۰۰ g سانتریفوژ نموده تا رسوبی از اسپرم ها تشکیل شود سپس مایع رویی جدا گردید. ۱۰ میلی لیتر محلول (Fetal calf serum) 10% Ham's+FCS روی رسوب ریخته و بطور یکنواخت مخلوط گردید. این عمل دو بار تکرار شده و در نهایت غلظت آن به ۵ میلیون رسانیده شد.

حجمی از نمونه جهت انجام تست Zeta و باقی مانده آن به عنوان نمونه کنترل استفاده گردید. سپس ارزیابی مورفولوژی اسپرم (رنگ آمیزی پاپانیکولاو) بر اساس معیار Strict criteria (۲۵)، کمبود پروتئین (رنگ آمیزی کرومومایسین A3) (۱۵) و فراگمتاسیون DNA به روش SCD انجام گرفت (۲۶).

ارزیابی کمبود پروتئین به روش رنگ آمیزی کرومومایسین A3/CMA3:

محلول فیکساتیو کارنوی (متانول و اسید استیک به نسبت ۳ به ۱) را بطور هم حجم با نمونه اسپرمی مخلوط کرده و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴- درجه گذاشته می شود سپس اسمیری از آن تهیه گردید. به منظور انجام رنگ آمیزی CMA3، هر اسلاید به مدت ۲۰ دقیقه با ۱۰۰ میکرولیتر از محلول CMA3 رنگ آمیزی گردید. [۷ میلی لیتر اسید استیک ۰/۱ مولار را به ۳۲/۹ میلی لیتر از محلول دی سدیم فسفات هیدراته ۰/۲ مولار اضافه نموده و pH آن به ۷ رسانیده می شود (بافر مک الوین). سپس کلرید منیزیم ۱۰ میلی مولار به آن اضافه می گردد]. اسلایدها توسط PBS (Phosphate buffered saline) شستشو داده شده و بعد لامل گذاری صورت گرفت. سپس با استفاده از میکروسکوپ فلئورسانت Olympus (BX51, Tokyo, Japan) با فیلتر ۴۶۰-۴۶۰ در همان روز ۱۰۰ اسپرم شمارش شد. درصد اسپرم های با رنگ زرد درخشان (CMA⁺3) و اسپرم های با رنگ زرد

تیره (CMA⁻3) با استفاده از نرم افزار Olysia (Olympus, DP70, Japan) محاسبه گردید (۱۵).

ارزیابی فراگمتاسیون DNA به روش SCD (Sperm chromatin dispersion):

۰/۷ درصد از آگاروز ۱ درصد (با درجه ذوب پایین: low melting) در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد با نمونه اسپرمی مخلوط گردید. سپس بر روی لامی که از قبل با آگاروز ۰/۶۵ درصد پوشیده شده، قرار گرفت و با گذاشتن یک لامل بر روی آن، به مدت ۴ دقیقه در دمای ۴- درجه سانتیگراد گذاشته شد. سپس با دقت لامل را از سطح لام جدا کرده و هر لام به صورت افقی در محلول اسید کلریدریک ۰/۰۸ درصد به مدت ۷ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی قرار داده شد. سپس در درجه حرارت اتاق، به مدت ۱۰ دقیقه در محلول تجزیه کننده ۱ (0.4 M, and 50mM EDTA, PH 7.5) و به دنبال آن در محلول تجزیه کننده ۲ (0.4 M Tris, 2M NaCl, and 1% SDS, PH 7.5) به مدت ۵ دقیقه قرار گرفت. لام در بافر Tris borate (0.09 M Tris-borate and 0.002 M EDTA, PH 7.5) به مدت ۲ دقیقه شستشو شده و به ترتیب در الکل ۷۰، ۹۰، ۱۰۰ درصد هر کدام به مدت ۲ دقیقه آب گیری می گردد و بعد از خشک شدن، با محلول رنگ Wright (Merck, 1.01383.0500) رنگ آمیزی شده و بعد از ۱۰ دقیقه با آب معمولی شستشو داده و توسط میکروسکوپ نوری بررسی گردید. با استفاده از این روش می توان میزان فراگمتاسیون DNA را بصورت ۵ حالت با توجه به وجود هاله اطراف هسته و اندازه آن بررسی نمود. اسپرمهای با فراگمتاسیون DNA (هسته اسپرم با هاله کوچک، بدون هاله و سلول اسپرم تخریب شده) و بدون فراگمتاسیون DNA (هسته اسپرم با هاله بزرگ و هاله متوسط) بررسی و بصورت درصد فراگمتاسیون DNA ارزیابی شد (۲۶).

تست Zeta:

لوله حاوی محلول اسپرمی، جهت باردار شدن

یافته ها:

پس از انجام تست Zeta بر روی نمونه ها و مقایسه آن با گروه کنترل، پارامترهای مورفولوژی، کمبود پروتئین و فراگمتاسیون DNA بررسی گردید. با توجه به اینکه متد Zeta قادر به جداسازی مقدار کمی اسپرم می باشد، در این مطالعه از بیماران نابارور با غلظت کمتر از ۵ میلیون و تحرک کمتر از ۵ درصد استفاده نشد.

در گروه کنترل میانگین درصد اسپرم های با مورفولوژی غیر طبیعی ۸۸/۱۹±۷/۳۷ و غلظت اسپرم برحسب میلیون در میلی لیتر ۵۳/۶۸±۳۲/۹۰ و درصد تحرک اسپرم ۴۶/۹۵±۱۷/۴۶ است. بعلاوه درصد کمبود پروتئین ۶۷/۱۷±۱۷/۳۴ و درصد فراگمتاسیون DNA ۳۲/۸۷±۸/۶۵ می باشد. در حالی که در گروه Zeta

در داخل دستکش لاتکس قرار گرفته و سه مرتبه چرخانده و سریع بیرون کشیده می شود و سپس به مدت یک دقیقه در هوای آزمایشگاه گذاشته تا اسپرم های بالغ دارای بار منفی به جدار لوله بچسبند. لوله فوق را به مدت ۵ دقیقه ساترینفوژ نموده سپس رسوب تشکیل شده و محلول اسپرم های درونش را به آرامی از ته لوله خارج نموده و جدار لوله با ۵۰۰ میکرولیتر Ham's+FCS10% شسته می شود. اسمیری از این نمونه ها تهیه و لامها فیکس می گردند (۵). رنگ آمیزی پاپانیکولا، تست SCD و رنگ آمیزی CMA3 روی این نمونه ها انجام گرفت. روش های مذکور نیز بر روی نمونه کنترل انجام شد. آنالیز داده ها به روش ضریب همبستگی و آزمون t زوجی انجام گرفت.

جدول شماره ۱: مقایسه گروه های مورد بررسی از لحاظ درصد مورفولوژی غیر طبیعی، درصد کمبود پروتئین و فراگمتاسیون DNA

گروه ها	کنترل		Zeta		پارامترهای مورد بررسی
	حداقل	حداکثر	حداقل	حداکثر	
درصد مورفولوژی غیر طبیعی	۶۴/۰۰	۱۰۰/۰۰	۸۸/۱۹±۷/۳۷	۹۸/۰۰	۸۰/۱۷±۱۰/۲۶
درصد کمبود پروتئین	۲۱/۰۰	۹۸/۰۰	۶۷/۱۷±۱۷/۳۴	۱۷/۰۰	۵۸/۴۰±۱۸/۲۰
درصد فراگمتاسیون	۱۳/۰۰	۶۸/۰۰	۳۲/۸۷±۸/۶۵	۱/۰۰	۱۸/۱۹±۸/۶۴

- $P < 0/001$ بین دو گروه در تمام پارامترهای مورد بررسی.

فراگمتاسیون DNA و مورفولوژی غیر طبیعی اسپرم رابطه معنی داری مشاهده نگردید ($P > 0/05$, $t = 0/205$).

بحث:

امروزه در مراکز باروری و ناباروری پس از آنالیز معمول مایع منی، با توجه به این که کیفیت این مایع در افراد مختلف هتروژن بوده و در انزال های یک فرد نیز این هتروژنیته وجود دارد، مایع منی را جهت جداسازی اسپرمهای سالم (با تحرک بیشتر و مورفولوژی طبیعی) شستشو داده و آماده سازی می نمایند (۲۷، ۲۸). در این مطالعه از روش جداسازی

میانگین اسپرم ها با مورفولوژی غیر طبیعی ۸۰/۱۷±۱۰/۲۶ می باشد. بعلاوه درصد کمبود پروتئین ۵۸/۴۰±۱۸/۲۰ و درصد فراگمتاسیون DNA ۱۸/۱۹±۸/۶۴ است. اختلاف معنی داری در درصد اسپرم های با مورفولوژی غیر طبیعی، درصد فراگمتاسیون DNA و درصد کمبود پروتئین در دو گروه کنترل و Zeta وجود داشت ($P < 0/001$) (جدول شماره ۱). در میان پارامترهای مایع منی، یک رابطه معنی داری بین درصد اسپرم های CMA3 مثبت و مورفولوژی اسپرم وجود دارد ($P < 0/05$ و $t = 0/441$). همچنین بین کمبود پروتئین و فراگمتاسیون DNA از لحاظ آماری یک رابطه معنی داری مشاهده شد ($P < 0/05$ و $t = 0/408$) ولی بین

Zeta که بر اساس شارژ الکتریکی سطح اسپرم است، استفاده شد و پارامترهای مورفولوژی، کمبود پروتامین و فراگمتاسیون DNA بررسی و با گروه کنترل مقایسه گردید.

Chan و همکارانش روش Zeta را بر روی نمونه‌های اسپرمی انجام داده و با استفاده از رنگ آمیزی آکریدین اورانژ و آنیلین بلو سلامت کروماتین اسپرم را مورد بررسی قرار دادند. نتایج تحقیقات این محققین بیانگر آن است که این روش باعث بهبود پارامترهای اسپرمی از قبیل حرکت شلاقی و حرکت پیش رونده اسپرم‌ها به اندازه دو برابر نسبت به نمونه کنترل می‌گردد. همچنین این محققین نشان دادند که اسپرم‌های جدا شده نیز از نظر سلامت DNA و بلوغ اسپرم از کیفیت بالاتری نسبت به گروه کنترل برخوردار هستند (۵).

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که هر سه پارامتر مورفولوژی، کمبود پروتامین و فراگمتاسیون DNA بطور معنی داری در اسپرم‌های جدا شده توسط روش Zeta نسبت به گروه کنترل بهبود یافته است. در بررسی حاضر یک رابطه معنی داری بین کمبود پروتامین و فراگمتاسیون DNA نیز مشاهده شد. این نتیجه را می‌توان چنین توجیه نمود که اسپرم‌ها در مسیر بلوغ خود در اواخر مرحله اسپرمیوژنز دچار یکسری تغییرات بیوشیمیایی و مورفولوژیک می‌شوند از جمله قرار گرفتن پروتامین سرشار از آرژنین و سیستئین به جای هیستون می‌باشد که منجر به تراکم کروماتین اسپرم می‌شود. مطالعات قبلی نشان داده که تراکم کروماتین باعث حفاظت DNA در برابر عوامل آسیب‌زا و استرس‌های خارجی از قبیل اکسیداسیون یا درجه حرارت بالا می‌شود، همچنین باعث تسهیل انتقال اسپرم در مجرای تناسلی ماده می‌گردد. بنابراین اسپرم‌هایی که دچار کمبود پروتامین هستند بیشتر مستعد فراگمتاسیون DNA می‌باشند (۲۹، ۳۰).

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که روش Zeta باعث بهبودی به اندازه دو برابر در درصد

فراگمتاسیون DNA اسپرم‌ها می‌شود که این مسئله نشانگر وجود رابطه نزدیک بین تکامل هسته و غشای اسپرم می‌باشد، زیرا روش Zeta اسپرم‌ها را بر اساس شارژ الکتریکی موجود در سطح غشا که وابسته به وجود گلیکوپروتئین‌های افزوده شده به سطح غشا در روند تکامل است، جدا می‌کند. بعلاوه در طی روند اسپرمیوژنز با جابجایی هیستون با پروتامین بلوغ هسته هم تکمیل می‌گردد. در نتیجه در طی این روند اسپرم‌هایی که جابجایی هیستون با پروتامین را به خوبی انجام داده‌اند احتمالاً تغییرات غشا هم خوب صورت گرفته و اضافه شدن گلیکوپروتئین‌ها در چنین اسپرم‌هایی بطور صحیح و کامل انجام می‌شود بنابراین روش Zeta به جداسازی اسپرم‌های دارای هسته و غشا طبیعی کمک می‌کند.

نتایج حاصل از این مطالعه همانند مطالعات قبلی بیانگر یک رابطه معنی داری بین کمبود پروتامین به روش CMA3 مثبت و مورفولوژی اسپرم است. حضور اسپرم با مورفولوژی غیر طبیعی بیانگر آن است که اسپرماتوزوا نتوانسته فرایند اسپرمیوژنز را تکمیل کند هر عاملی که بر فرآیند اسپرمیوژنز تاثیر گذارد نه تنها میزان تراکم کروماتین بلکه مورفولوژی اسپرم را تحت تاثیر قرار می‌دهد. در نتیجه افزایش ناهنجاری‌های مورفولوژی اسپرم احتمالاً با افزایش کمبود پروتامین همراه است (۳۱، ۳۲).

در هنگام انجام روش Zeta محدودیتهایی وجود دارد. در طی این روند، محیط اسپرم نباید حاوی سرم یا آلبومین باشد. به دلیل این که اضافه کردن پروتئین باعث خنثی شدن بار الکتریکی سطح لوله و غشای اسپرم و جدا شدن اسپرم‌ها از جدار لوله بارداری می‌شود (۳۳، ۳۴، ۳۵). همچنین روش Zeta باید سریع انجام گیرد زیرا گذشت زمان باعث ظرفیت یابی اسپرم و حذف یکسری گلیکوپروتئین‌ها از غشای اسپرم و در نتیجه کاهش بار منفی سطحی آن می‌گردد (۳۵). اسپرم‌های حاوی کروموزوم X دارای بار منفی بیشتری نسبت به اسپرم‌های دارای کروموزوم Y می‌باشند. بنابراین احتمالاً روش

از آن است که روش Zeta قادر به جداسازی اسپرم با مورفولوژی و ساختار کروماتین طبیعی است. لذا در آینده می توان از این متد در جداسازی اسپرم برای روش ICSI استفاده کرد.

تشکر و قدردانی:

این مقاله از نتایج طرح تحقیقاتی مصوب پژوهشکده رویان است و نویسندگان مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از مسئولین پژوهشکده رویان و متخصصین و پرسنل مرکز باروری و ناباروری اصفهان ابراز می دارند.

Zeta باعث جمع آوری اسپرم هایی که بیشتر حاوی کروموزوم x هستند، می شود (۳۷،۳۶،۷). یکی از خصوصیات روش Zeta این است که تعداد کمی اسپرم در انتهای کار جمع آوری می شود و این بیانگر این است که این روش در افراد اولیگوزوسپرمیک کارآیی زیادی ندارد و نیز انجام عمل Zeta روی اسپرم هایی که از ناحیه بیضه گرفته شده کارآیی ندارد چون این اسپرم ها هنوز به قدر کافی بار منفی پیدا نکرده اند (۳۸).

نتیجه گیری:

نتایج حاصل از این مطالعه و سایر مطالعات حاکی

منابع:

1. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*. 1992 Jul; 340(8810): 17-8.
2. Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F. Selection of spermatozoa with normal nuclei to improve the pregnancy rate with intracytoplasmic sperm injection. *N Engl J Med*. 2001 Oct; 345(14): 1067-8.
3. Jakab A, Sakkas D, Delpiano E, Cayli S, Kovanci E, Ward D, et al. Intracytoplasmic sperm injection: a novel selection method for sperm with normal frequency of chromosomal aneuploidies. *Fertil Steril*. 2005 Dec; 84(6): 1665-73.
4. Ainsworth C, Nixon B, Aitken RJ. Development of a novel electrophoretic system for the isolation of human spermatozoa. *Hum Reprod*. 2005 Aug; 20(8): 2261-70.
5. Chan PJ, Jacobson JD, Corselli JU, Patton WC. A simple zeta method for sperm selection based on membrane charge. *Fertil Steril*. 2006 Feb; 85(2): 481-6.
6. Said T, Agarwal A, Grunewald S, Rasch M, Baumann T, Kriegel C, et al. Selection of nonapoptotic spermatozoa as a new tool for enhancing assisted reproduction outcomes: an *in vitro* model. *Biol Reprod*. 2006 Mar; 74(3): 530-7.
7. Ishijima SA, Okuno M, Mohri H. Zeta potential of human X- and Y-bearing sperm. *Int J Androl*. 1991 Oct; 14(5): 340-7.
8. Focarelli R, Rosati F, Terrana B. Sialoglycoconjugates release during in vitro capacitation of human spermatozoa. *J Androl*. 1990 Mar-Apr; 11(2): 97-104.
9. Della Giovampaola C, Flori F, Sabatini L, Incerti L, La Sala GB, Rosati F, et al. Surface of human sperm bears three differently charged CD52 forms, two of which remain stably bound to sperm after capacitation. *Mol Reprod Dev*. 2001 Sep; 60(1): 89-96.
10. Srivastava PN, Farooqui AA. Studies on neuraminidase activity of the rabbit endometrium. *Biol Reprod*. 1980 May; 22(4): 858-63.
11. Rooney IA, Heuser JE, Atkinson JP. GPI-anchored complement regulatory proteins in seminal plasma. An analysis of their physical condition and the mechanisms of their binding to exogenous cells. *J Clin Invest*. 1996 Apr; 97(7): 1675-86.
12. Kirchhoff C, Hale G. Cell-to-cell transfer of glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins during sperm maturation. *Mol Hum Reprod*. 1996 Mar; 2(3): 177-84.

13. Kirchhoff C. CD52 is the major maturation-associated sperm membrane antigen. *Mol Hum Reprod*. 1996 Jan; 2(1): 9-17.
14. Iranpour FG, Nasr-Esfahani MH, Valojerdi MR, al-Taraihi TM. Chromomycin A3 staining as a useful tool for evaluation of male fertility. *J Assist Reprod Genet*. 2000 Jan; 17(1): 60-6.
15. Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Mardani M. Relation between different human sperm nuclear maturity tests and in vitro fertilization. *J Assist Reprod Genet*. 2001 Apr; 18(4): 219-25.
16. Razavi S, Nasr-Esfahani MH, Mardani M, Mafi A, Moghdam A. Effect of human sperm chromatin anomalies on fertilization outcome post-ICSI. *Andrologia*. 2003 Aug; 35(4): 238-43.
17. Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Mozdarani H, Mardani M, Azvagi H. Relationship between protamine deficiency with fertilization rate and incidence of sperm premature chromosomal condensation post-ICSI. *Andrologia*. 2004 Jun; 36(3): 95-100.
18. Lolis D, Georgiou I, Syrrou M, Zikopoulos K, Konstantelli M, Messinis I. Chromomycin A3-staining as an indicator of protamine deficiency and fertilization. *Int J Androl*. 1996 Feb; 19(1): 23-7.
19. Nasr-Esfahani MH, Salehi M, Razavi S, Mardani M, Bahramian H, Steger K, et al. Effect of protamine-2 deficiency on ICSI outcome. *Reprod Biomed Online*. 2004 Dec; 9(6): 652-8.
20. Nasr-Esfahani MH, Salehi M, Razavi S, Anjomshoa M, Rozbahani S, Moulavi F, et al. Effect of sperm DNA damage and sperm protamine deficiency on fertilization and embryo development post-ICSI. *Reprod Biomed Online*. 2005 Aug; 11(2): 198-205.
21. Zini A, Bielecki R, Phang D, Zenzes MT. Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertil Steril*. 2001 Apr; 75(4): 674-7.
22. Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchi PG, Bianchi U. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod*. 1999 Jan; 4(1): 31-7.
23. Shen H, Ong C. Detection of oxidative DNA damage in human sperm and its association with sperm function and male infertility. *Free Radic Biol Med*. 2000 Feb; 28(4): 529-36.
24. W.H.O: WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press; 1999.
25. Kruger TF, Menkveld R, Stander FS, Lombard CJ, Van der Merwe JP, van Zyl JA, et al. Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 1986 Dec; 46(6): 1118-23.
26. Fernández JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vazquez R, Alvarez JG. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl*. 2003 Jan-Feb; 24(1): 59-66.
27. Sakkas D, Manicardi GC, Tomlinson M, Mandrioli M, Bizzaro D, Bianchi PG, et al. The use of two density gradient centrifugation techniques and the swim-up method to separate spermatozoa with chromatin and nuclear DNA anomalies. *Human Reproduction*. 2000; 15: 1112-16.
28. Tomlinson MJ, Moffatt O, Manicardi GC, Bizzaro D, Afnan M, Sakkas D. Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation: implications for assisted conception. *Hum Reprod*. 2001 Oct; 16(10): 2160-5.
29. Larson-Cook KL, Brannian JD, Hansen KA, Kasperson KM, Aamold ET, Evenson DP. Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril*. 2003 Oct; 80(4): 895-902.
30. Chohan KR, Griffin JT, Lafromboise M, Dejonge CT, Carrell DT. Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *J of Andrology*. 2006; 27: 53-9.

31. Huszar G, Vigue L, Oehninger S. Creatine kinase immunocytochemistry of human sperm-hemizona complexes: selective binding of sperm with mature creatine kinase-staining pattern. *Fertil Steril*. 1994 Jan; 61(1): 136-42.
32. Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Tavalae M. Failed fertilization after ICSI and spermiogenic defects. *Fertil Steril*. 2008 Apr; 89(4): 892-8.
33. Kaneko S, Oshio S, Kobayashi T, Iizuka R, Mohri H. Human X- and Y-bearing sperm differ in cell surface sialic acid content. *Biochem Biophys Res Commun*. 1984 Nov; 124(3): 950-5.
34. Chaudhuri AR, Datta H. A novel technique for isolation of pure sperm heads from disintegrated mammalian spermatozoa. *Prep Biochem*. 1994 Nov; 24(3-4): 185-92.
35. Iqbal N, Hunter AG. Comparison of various bovine sperm capacitation systems for their ability to alter the net negative surface charge of spermatozoa. *J Dairy Sci*. 1995 Jan; 78(1): 84-90.
36. Cartwright EJ, Harrington PM, Cowin A, Sharpe PT. Separation of bovine X and Y sperm based on surface differences. *Mol Reprod Dev*. 1993 Mar; 34(3): 323-8.
37. Manger M, Bostedt H, Schill WB, Mileham AJ. Effect of sperm motility on separation of bovine X- and Y-bearing spermatozoa by means of free-flow electrophoresis. *Andrologia*. 1997 Jan-Feb; 29(1): 9-15.
38. Stoffel MH, Busato A, Friess AE. Density and distribution of anionic sites on boar ejaculated and epididymal spermatozoa. *Histochem Cell Biol*. 2002 May; 117(5): 441-5.